



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 07 854 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 07 K 5/12
A 61 K 38/12

⑦1 Aktenzeichen: 197 07 854.0
⑦2 Anmeldetag: 27. 2. 97
⑦3 Offenlegungstag: 3. 9. 98

DE 197 07 854 A 1

⑦1 Anmelder:

Dhein, Stefan, Priv. Doz. Dr.med., 50937 Köln, DE;
Grover, Rajiv, Dipl.-Chem., 51147 Köln, DE

⑦2 Erfinder:

gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Neue Cyclopeptide, deren Herstellung und Verwendung

⑤7 Antiarrhythmische Peptide wie das AAP10 (NH₂-Gly-Ala-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH₂) öffnen die interzellulären Gap-Junction-Kanäle, verbessern so die zelluläre Kommunikation zwischen den Zellen und eignen sich daher für die prophylaktische Behandlung bei Herzrhythmusstörungen.

Als wesentlicher Nachteil der Wirkstruktur AAP10 stellte sich eine geringe Stabilität in wäßrige Lösung (ca. Zwei Stunden) heraus. Ziel der weiteren Untersuchungen war daher eine Struktur mit gleicher Wirkung wie AAP10, aber mit höherer Stabilität zu finden.

Durch Cyclisierung der Grundstruktur von AAP10 wurde diese Stabilität erreicht. Dabei blieb die Wirkung gleich, die Stabilität erhöhte sich aber um das vierzehnfache.

Die neuen Cyclopeptide cycl.(CF₃C(OH)-Gly-Ala-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH) und cycl.(CO-Gly-Ala-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH) eignen sich zur Bekämpfung von Krankheiten.

DE 197 07 854 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Cyclopeptide sowie ein Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung bei der Bekämpfung von Krankheiten.

Herzrhythmusstörungen stellen eine der häufigsten finalen Todesursachen in den westlichen Industrienationen dar. Das Problem bei der Behandlung ist, daß die bisher therapeutisch verwendeten Antiarrhythmika in der Prophylaxe versagen und paradoxerweise selbst Herzrhythmusstörungen auslösen, d. h. diese Antiarrhythmika (z. B. Na-Kanal Antagonisten) sich nur für die akute Behandlung von Herzrhythmusstörungen eignen. Eine risikoarme Prophylaxe aber ist bisher noch nicht möglich.

Der Einsatz von Ionenkanalblockern, die als Antiarrhythmika die transmembranären Ionenkanäle (Calciumkanäle, Natriumkanäle und/oder Kaliumkanäle) blockieren, ist geeignet für die Therapie akuter bereits bestehender Herzrhythmusstörungen.

Werden aber diese Arzneimittel zur Prophylaxe von Arrhythmien eingesetzt, so ergeben sich Probleme. Diese Ionenkanalblocker zeigen ein hohes proarrhythmisches Risiko wenn sie zur Prophylaxe von Arrhythmien eingesetzt werden (Drugs 22, Suppl. 4 33-34, 1985; New England J. med. 324, 781, 1991; Circulation, 617-630, 1993).

Das hat zur Folge, daß gerade bei der Verabreichung von klassischen Antiarrhythmika paradoxerweise Arrhythmien provoziert werden. Daher sind diese Medikamente zur Prophylaxe nicht gut geeignet.

Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit der Suche nach neuen Substanzen für die prophylaktische Therapie.

Dabei fand sich ein neuartiges antiarrhythmisches Peptid (AAP) welches zuerst 1980 von Aonuma et al. (Chem. Pharm. Bull., (Tokyo), 28, 3332 (1980)) aus Rindervorhöfen isoliert wurde sowie davon abgeleitete synthetische Derivate deren Wirkungsmechanismus und Effektivität im Rahmen des experimentellen Herzinfarktes (kardiale Ischämie) erstmals 1994 von Dhein et al. (Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 350, 174 (1994)), gezeigt wurde. Es stellte sich heraus, daß diese antiarrhythmische Peptide die interzellulären Gap-Junction-Kanäle öffnen und so die zelluläre Kommunikation zwischen den Zellen verbessern (Circulation, 92, Supplement I, 3077 (Abstract) (1995)).

Dies stellt ein völlig neuartigen Mechanismus dar, der in vitro und in vivo antiarrhythmisch wirksam war.

Als wesentlicher Nachteil der Wirkstruktur AAP 10 ($\text{NH}_2\text{-Gly-Ala-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH}_2$) stellte sich eine geringe Stabilität in wäßrige Lösung (ca. Zwei Stunden) heraus. Eine solche Instabilität bedeutet einerseits erhebliche Beschränkungen in der Nutzung einer Substanz im experimentellen Rahmen, und stellt andererseits eine wesentliche Einschränkung für die Weiterentwicklung zum Arzneimittel dar. Ziel der weiteren Untersuchungen war daher eine Struktur mit gleicher Wirkung wie AAP10, aber mit höherer Stabilität zu finden.

Gegenstand der Erfindung sind die Peptide cycl ($\text{CF}_3\text{C(OH)-Gly-Ma-Oly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH}$), im folgenden als CCF₃AAP 10RG bezeichnet, und

cycl. ($\text{CO-Gly-Ala-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH}$) im folgenden als cAAP10RG bezeichnet

sowie die Verwendung dieser Peptide zur Bekämpfung von Krankheiten. Hyp bedeutet in den obigen Formeln die Aminosäure 4-Hydroxyprolin.

Die Peptide können nach den in der Peptidchemie üblichen Methoden hergestellt werden. Besonders eignen sich folgende Verfahren zu dessen Herstellung:

Festphasenpeptidsynthese an unlöslichen Polystyrol-Polyamid-Harzen nach einem modifizierten Merrifield-Verfahren entsprechend E. Atherton & R. C. Sheppard (Solid Phase Peptide Synthesis, IRL-Press, Oxford, 1989) unter Verwendung der Fmoc-Strategie.

Die Aktivierung für die Ankopplung der ersten Aminosäure an das Harz erfolgt über die Bildung des symmetrischen Anhydrids oder des Pentafluorphenolesters. Die restlichen Aminosäuren werden als 1-Hydroxy-benzotriazolestern angebracht.

Die Ausbildung eines Peptid-Ringes verlangt, wie andere Cyclisierungen auch, die Aktivierung der endständigen Gruppen und deren intramolekulare Reaktion. Bei einer Peptidbindung ist dies oft die freie Aminogruppe und eine Carboxygruppe, die für einen nucleophilen Angriff zuvor aktiviert wurde. Diese Reaktionen laufen bei hoher Verdünnung von 10^{-3} - 10^{-4} mol/l, "Principle of Dilution", ab. Um intermolekulare Reaktionen zu verhindern ist es wünschenswert, die Aktivierungs- und Cyclisierungsprozesse voneinander zu trennen.

Bei den Methoden, die die Aktivierung und die Cyclisierung trennen, haben sich vor allem die Aktiv-Ester- und die Azid-Methode bewährt. Der Vorteil der Aktiv-Ester Methode ist, daß die Aktivierung und die Cyclisierung voneinander getrennt ablaufen. Durch die Reaktion des linearen Peptids mit p-Nitrophenol und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wird der Ester gebildet. Die Cyclisierung erfolgt in Lösung, die frei von acylierbaren Nucleophilen wie Wasser, Alkohol oder Aminen sein soll.

Bei diesem Patent handelt es sich um eine Methode, wobei das lineare Peptid zuerst nach Curphey (J. Org. Chem., 44 2805 (1979)) trifluoracetyliert wird, und dann über die Trifluoracetylbrücke cyclisiert wird.

Das besondere der Wirkung des neuen Peptids besteht darin, daß unter dem Einfluß der Substanz lokale Unterschiede in der Aktionspotentialdauer und Irregularitäten der Erregungsausbreitung, welche beide im Rahmen von z. B. Herzinfarkten oder mit steigendem Alter auftreten, unterdrückt werden.

Vor allem besteht der Unterschied aber, im Vergleich zu AAP 10 darin, daß dieses cyclische Peptid viel stabiler ist (Steigerung der Stabilität um über das 14fache) und überraschenderweise die gleiche Wirkung zeigt. So zerfällt dieses cyclische Peptid in wäßriger Lösung und bei Raumtemperatur auch nach 28 Stunden nicht.

Die Erfindung erlaubt eine prophylaktische Therapie von Ischämie-assoziierten und Altersassoziierten Herzrhythmusstörungen. Dabei weist die Substanz im Gegensatz zu herkömmlichen Antiarrhythmika im in vitro Versuch kein nennenswertes proarrhythmisches Risiko auf. Gegenüber bekannten Substanzen zeigt das neue Peptid eine höhere Potenz und eine höhere erreichbare Maximalwirkung.

DE 197 07 854 A 1

Beispiele

1. Synthese des Peptids(CF₃CO-Gly-Ala-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH₂)

Es wurde nach dem bekannten Syntheseprotokoll in Fmoc-Strategie nach Atherton & Sheppard verfahren. Bei einem Beladungsgrad von 0.6 mmol/g des Harzes wurden 290 mg Rink-Harz vorgelegt, mit N,N-Dimethylformamid (DMF) vorgequollen und danach die Fmoc-Schutzgruppe mit einer Lösung aus 20% Piperidin in DMF abgespalten. Nach Spülen mit DMF werden 1 mmol Fmoc-Tyrosin(tBu)₂O und Dicyclohexylcarbodiimid in DMF dazugegeben. Nach Spülen mit DMF wird die Schutzgruppe wieder mit 20% Piperidin abgespalten und nach weiterem Spülen die nächste Aminosäure als OBt-Ester angebracht. Hierzu wurde 0.5 mmol Fmoc-Prolin-OH zusammen mit O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluorborat (TBTU), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF mit der ersten Aminosäure umgesetzt. Nach Spülen wurde die Schutzgruppe wie o. a. abgespalten und nach weiterem Spülen mit DMF die nächste Aminosäure Fmoc-Hydroxyprolin(tBu)-OH wie oben beschrieben angebracht. Nach jeweils Spülen und Abspalten wurden so die restlichen Aminosäuren Fmoc-Glycin-OH, Fmoc-Alanin-OH und Fmoc-Glycin-OH gekoppelt. Am Ende wurde die Schutzgruppe abgespalten, das Harz gespült und bei 0.1 mbar für acht Stunden getrocknet.

Die Trifluoracetylierung des Peptids erfolgt nach T. J. Curphey (J. Org. Chem. 44, 2805 (1979)), mit Triethylamin, Ethyltrifluoracetat und DOWEX 50 Harz (H⁺-Form), bei 10°C für zwei Stunden.

Die Abspaltung des fertigen linearen Peptids vom Harz erfolgt mit 3 ml einer Lösung aus Trifluoressigsäure, 5% Anisol und 5% Wasser über zwei Stunden. Die Lösung wird abgesaugt, einrotiert, in Eisessig gelöst, mit Diethylether ausgefällt und bei 0.1 mbar getrocknet.

Man erhält 30 mg des linearen Peptids (Molmasse: 671.63).

2. Darstellung des cycl. (CF₃C(OH)-Gly-Ala-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH)

10 mg des linearen Peptids werden nach Lösen in Wasser/Methanol mit 3 mg Dicyclohexylcarbodiimid für drei Tage bei 0°C und für drei Tage bei Raumtemperatur umgesetzt. Danach wird der Diimid-Überschuß durch Zugabe von Eisessig zerstört. Es wird zur Trockene einrotiert, in Eisessig gelöst, mit Diethylether ausgefällt und bei 0.1 mbar getrocknet.

Man erhält 1.5 g (15%) des cyclischen Peptids (Molmasse: 671.63).

3. Darstellung des cycl. (CO-Gly-Ala-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH)

Die Darstellung des cycl(CO-Gly-Ala-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH) erfolgt analog Punkt 2.

Man erhält 0.5 g (5%) des cyclischen Peptids (Molmasse: 601.62).

Anwendung

Die cyclischen Peptide CCF₃AAP10RG und cAAP10RG wurden an isolierten, nach der Langendorff-Technik druckkonstant (70 cm H₂O) mit Tyrodelösung perfundierten Kaninchenherzen intracoronar in steigenden Konzentrationen (10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ mol/l) infundiert, und es wurde simultan ein epikardiales Potentialmapping durchgeführt, vgl. J. Pharmacol. Methods 22, 197 (1989); Circulation 87, 617 (1993).

Bei diesen Untersuchungen wurden an 256 Stellen der epikardialen Herzoberfläche simultan ein unipolares Elektrokardiogramm registriert, so daß daraus an allen 256 Orten die lokale epikardiale Aktionspotentialdauer bestimmt werden konnte. Aus diesen Daten wurde dann die Verteilungsdauer der Aktionspotentiale um den Mittelwert und die Änderung dieser Verteilung durch die Substanz im Vergleich zu AAP10 geprüft. Es zeigte sich für alle drei Substanzen eine zunehmende Leptocurtosis der Kurve, d. h. unter dem Einfluß von AAP10 wie auch unter dem der neuen cyclischen Peptide lagen konzentrationsabhängig zunehmend mehr Werte in der Nähe des Mittelwertes (± 5 ms dARI). So fanden sich unter Kontrollbedingungen 59% aller Werte in einem Bereich um ± 5 ms um den Mittelwert, unter AAP10 dagegen bis zu maximal 74% (10⁻⁸ mol/l), unter den cyclischen Peptide sogar noch etwas mehr. Das bedeutet, daß durch die neuen cyclischen Peptide die Dispersion der epikardialen Aktionspotentialdauer deutlich gesenkt wird und daß diese Senkung etwas höher als die durch AAP10 erreichbare ist.

Tabelle 1

Häufigkeitsverteilung der ARI-Dauer um den Mittelwert

Angegeben ist der Prozentsatz aller Werte, die in einem Intervall von ±5 ms um den Mittelwert liegen unter dem antiarrhythmischen Peptid AAP10 und dem neuen cyclischen Peptid (CCF₃AAP10RG).

Peptid	MW	BSA	1e ⁻¹⁰ M	1e ⁻⁹ M	1e ⁻⁸ M	1e ⁻⁷ M	δ _{max}	n
AAP10	575.6	100±0.0	107.8±7.7	113.5±6.9	121.2±6.3	117.3±8.9	21%	5
CCF ₃ AAP10RG	671.6	100±0.0	108.6±10.3	123.1±13	118.9±14.6	123.4±15.2	23%	6

Entscheidend ist aber die verbesserte Stabilität in Lösung. So waren die neuen Cyclopeptide in wäßriger Lösung immer noch stabil nachdem sie fünfmal hintereinander aufgetaut und eingefroren wurden (zu erkennen im High Pressure

DE 197 07 854 A 1

Liquid Chromatography-(HPLC)-Chromatogramm darin, daß sich der ursprüngliche Peak nicht veränderte und die Retentionszeit (RZ) gleich blieb, siehe auch Tabellen 3 und 4). Die substanzcharakteristische Retentionszeit bei der HPLC änderte sich nicht. Das lineare Peptid AAP10 war demgegenüber bereits nach zweimaligem Auftauen zerstört (zu erkennen im HPLC-Chromatogramm darin, daß sich der ursprüngliche Peak in zwei spaltet).

Tabelle 2

HPLC-Daten¹ der neuen Cyclopeptide

Peptid	RZ [min]
AAP10	12.40
CCF ₃ AAP10RG	9.15
cAAP10RG	10.20

¹ (HPLC: Säule: Hypersil ODS μ 25 mm x 4 mm; Lösungskonzentration: 1 mg/ml; Laufmittel: 95% Wasser, 5% Acetonitril, 0.1% Trifluoressigsäure).

Tabelle 3

HPLC-Daten² der Peptide nach wiederholtem Auftauen und Einfrieren

Peptid		1.	2.	3.	4.	5.
AAP10	RZ	12.00	11.58/12.15	-	-	-
	F	1	0.45/0.54	-	-	-
CCF ₃ AAP10RG	RZ	9.50	9.60	9.33	9.48	9.47
	F	1	1	0.98	0.91	0.92

² (RZ=Retentionszeit in min; F=Peakfläche (normalisiert, $I_{\text{AAP10}}=3.8 \cdot 10^5$, $I_{\text{CCF}_3\text{AAP10RG}}=1.181 \cdot 10^5$; 1.-5.=1. bis 5. Auftauen; siehe auch ¹)).

Tabelle 4

HPLC-Daten³ der Peptide bei Stehenlassen bei Raumtemperatur

Peptid		1h	2h	4h	5h	6h	8h	28h
AAP10	RZ	12.40	12.20/12.35	-	-	-	-	-
	F	1	0.64/0.36	-	-	-	-	-
CCF ₃ AAP10RG	RZ	9.35	9.35	9.40	9.20	9.30	9.50	9.30
	F	1	0.999	0.998	0.998	0.995	0.994	0.993

³ (Peakfläche F, normalisiert, $I_{\text{CCF}_3\text{AAP10RG}}=6.309 \cdot 10^5$, $I_{\text{AAP10}}=4.044 \cdot 10^5$; siehe auch ¹).

Bei Aufbewahren des linearen Peptids AAP10 zeigte sich ein Zerfall nach 2 h (bei Raumtemperatur) in wäßriger Lösung. Im Vergleich hierzu war das CCF₃AAP10RG überraschenderweise wesentlich stabiler und zerfiel auch nach 28 h noch nicht.

Patentansprüche

1. cycl.(CF₃C(OH)-Gly-Ala-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH).
2. cycl.(CF₃C(OH)-Gly-Ma-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH) zur Verwendung bei der Bekämpfung von Krankheiten.
3. cycl.(CO-Gly-Ala-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH).
4. cycl.(CO-Gly-Ala-Gly-4-Hyp-Pro-Tyr-CONH) zur Verwendung bei der Bekämpfung von Krankheiten.